

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2002-541767
(P2002-541767A)

(43)公表日 平成14年12月10日 (2002.12.10)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	チ-マコ-ト [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/15		1/19	4 B 0 6 5
1/19		1/21	4 C 0 6 2
1/21		C 1 2 Q 1/68	Z 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-591204(P2000-591204)
(86) (22)出願日	平成11年12月23日(1999.12.23)
(85)翻訳文提出日	平成13年6月22日(2001.6.22)
(86)国際出願番号	P C T / C A 9 9 / 0 1 2 3 5
(87)国際公開番号	W O 0 0 / 3 9 3 1 4
(87)国際公開日	平成12年7月6日(2000.7.6)
(31)優先権主張番号	9 8 2 8 7 0 9. 7
(32)優先日	平成10年12月24日(1998.12.24)
(33)優先権主張国	イギリス (G B)

(71)出願人	ノーベーション ファーマシューティカルズ インコーポレーテッド カナダ、ブリティッシュ コロンビア ブイ3ジェイ 3ビー6、コキトラム、リーガン アベニュー 1323
(72)発明者	カステリック、タニア カナダ、ブリティッシュ コロンビア ブイ3ジェイ 3ビー6、コキトラム、リーガン アベニュー 1323
(74)代理人	弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 m R N A の安定性に影響する化合物を同定するためのアッセイ

(57)【要約】

m R N A 安定性に影響する、特にm R N A 分解を誘導する化合物の同定方法において、試験化合物の不存在下で検出可能なシグナルを有するタンパク質を発現することができ、ここでタンパク質をコードし、発現システムから転写されるm R N A が少なくとも1つのm R N A 不安定配列のコピーを含むD N A 発現システムが、試験化合物と接触し、検出可能なシグナルを、試験化合物の存在下で測定し、対照と比較する、前記方法を提供する。この方法を用いて、不適切に安定化される際に疾病または医学的症状、例えばサイトカイン誘導炎症疾病を生じることができるm R N A 、例えばサイトカイン(例えばIL-1 β) m R N A の分解を誘導する化合物を同定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 m RNA安定性に影響する化合物の同定方法において、試験化合物の不存在下で検出可能なシグナルを有するタンパク質を発現することができ、ここでタンパク質をコードし、発現システムから転写されるm RNAが少なくとも1つのm RNA不安定配列のコピーを含むDNA発現システムが、試験化合物と接触し、検出可能なシグナルを、試験化合物の存在下で測定し、対照と比較する、前記方法。

【請求項 2】 m RNA分解を誘導する化合物の同定のためであり、該化合物を、該化合物の不存在下で検出可能なシグナルを有するタンパク質を発現することができるDNA発現システムと接触させ、ここでタンパク質をコードし、発現システムから転写されるm RNAは、m RNA不安定配列の少なくとも1つのコピーを含み、検出可能なシグナルを、試験化合物の存在下で測定し、得られた結果を対照と比較することを含む、請求項 1に記載の方法。

【請求項 3】 m RNA分解を誘導する化合物の比較方法において、該化合物を、該化合物の不存在下で検出可能なシグナルを有するタンパク質を発現することができるDNA発現システムと個別に接触させ、ここでタンパク質をコードし、発現システムから転写されるm RNAが、m RNA不安定配列の少なくとも1つのコピーを含み、検出可能なシグナルを、各試験化合物の存在下で測定し、得られたシグナルを比較することを含む、前記方法。

【請求項 4】 検出可能なシグナルを有するタンパク質の発現をコードする遺伝子を含み、ここで該遺伝子が、該タンパク質のアミノ酸配列を、適切な発現制御要素およびm RNA不安定配列の少なくとも1つのコピーに対応するDNAを含む関連する5'および3'UTR配列と共にコードするDNAを含む、レポーター遺伝子DNA発現システム。

【請求項 5】 請求項 4に記載のレポーター遺伝子DNA発現システムを含む安定にトランスフェクトした細胞系。

【請求項 6】 m RNAを不安定化する化合物の同定のためのアッセイシステムにおいて、

請求項 4において定義したレポーター遺伝子DNA発現システム、および

検出可能なシグナルを有するタンパク質の発現をコードする遺伝子を含み、ここで該遺伝子は、該タンパク質のアミノ酸配列を、適切な発現制御要素を含むが機能的mRNA不安定配列をすべて欠く関連する5'および3'UTR配列と共にコードするDNAを含む、制御DNA発現システムを含む、前記アッセイシステム。

【請求項7】 アッセイシステムにおいて、
請求項5に記載の安定にトランスフェクトした細胞系、および
請求項6において定義した制御DNA発現システムを含む安定にトランスフェクトした細胞系
を含む、前記アッセイシステム。

【請求項8】 請求項4に記載のレポーター遺伝子DNA発現システムおよび制御遺伝子DNA発現システムを含む安定にトランスフェクトした細胞系において、該制御遺伝子DNA発現システムが、レポーター遺伝子DNA発現システムのタンパク質とは異なる検出可能なシグナルを有するタンパク質の発現をコードする遺伝子を含み、ここで該制御遺伝子DNA発現システムは、該タンパク質のアミノ酸配列を、適切な発現制御要素を含むが機能的mRNA不安定配列をすべて欠く関連する5'および3'UTR配列と共にコードするDNAを含む、前記細胞系。

【請求項9】 請求項8に記載の安定にトランスフェクトした細胞系を含むアッセイシステム。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか1項に記載の方法によるか、または請求項4に記載のDNA発現システム、請求項5または8に記載の細胞系あるいは請求項6、7または9に記載のアッセイシステムを用いることにより同定されたときにmRNAを不安定化する化合物。

【請求項11】 請求項10に記載の化合物の、不適切なmRNA安定化および/または蓄積および所望でないタンパク質発現を伴う疾病または医学的症状の予防または治療への使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、生物学的に活性な化合物の同定のためのアッセイ、特にmRNA安定性に対して影響を有する化合物の同定のためのレポーター遺伝子アッセイに関する。

【0002】

近年、RNA半減期の調節が、遺伝子発現の厳密な制御において臨界的に重要な役割を有すること、およびmRNA分解が、高度に制御されたプロセスであることが、ますます明らかになっている。RNA不安定性は、転写速度の変化に対するmRNA転写レベルの迅速な上方調節または下方調節を可能にする。多くの臨界的に重要な細胞因子、例えば転写因子、例えばc-mycまたはホスト免疫応答に関連する遺伝子生成物、例えばサイトカインは、これらの通常の機能を遂行するために、一時的にのみ存在することが求められる。これらの因子をコードするmRNAの一時的な安定化は、これらのメッセージの蓄積および翻訳が、所要に応じて所望の細胞因子を発現するのを可能にし、一方非安定化正常条件の下では、これらのmRNAの迅速な変化速度は、細胞因子の発現を効率的に制限し、「スイッチオフ」する。しかし、mRNA安定性の異常な調節は、所望でない細胞トランスフォーメーション、例えば腫瘍形成に至る細胞因子の所望でない確立または不適切および組織損傷炎症応答に至り得る。

【0003】

mRNA安定性を制御する機構が、理解からは程遠い一方、配列領域は、多くのmRNAにおいて同定されており、これは、これらを含むmRNAに不安定性を付与すると考えられる。これらの配列領域を、本明細書中では「mRNA不安定配列」と呼ぶ。例えば、代表的なmRNA不安定領域は、ARE (AUに富む要素) であり、これは、多くの前初期遺伝子および炎症サイトカイン、例えばIL-1 β およびTNF α をコードする遺伝子を含む遺伝子の3'UTR (3'未翻訳領域)において見出される。

【0004】

本発明者等の係属中の英国特許出願第9828707.1号および98287

10. 5号に記載されたように、本発明者等は、mRNA不安定配列を含むmRNAの不安定性を促進する化合物を見出した。このような化合物を用いて、mRNAの分解を誘導し、これにより不適切なmRNA蓄積を防止または逆転させ、これにより所望でないタンパク質、例えばサイトカイン発現を減少させるかまたは防止することができる。従って、このような化合物は、不適切なmRNA安定化および蓄積並びに得られた所望でないタンパク質発現を伴う疾病または医学的症状の予防または治療のために、薬学的に潜在的に有用である。

【0005】

本発明は、mRNA不安定配列を含むmRNAの安定性に影響する化合物を同定するためのレポーター遺伝子アッセイに関する。

【0006】

従って、本発明は、mRNA安定性に影響する化合物の同定方法において、試験化合物の不存在下で検出可能なシグナルを有するタンパク質を発現することができ、ここでタンパク質をコードし、発現システムから転写されるmRNAが少なくとも1つのmRNA不安定配列のコピーを含むDNA発現システムが、試験化合物と接触し、検出可能なシグナルを、試験化合物の存在下で測定し、対照と比較する、前記方法を提供する。

【0007】

好ましくは、本発明の方法は、mRNA不安定配列を含むmRNAの不安定性を促進する化合物の同定のために適合される。レポーター遺伝子アッセイを用いて、組み合わせ化合物ライブラリーを含む、個別の化合物および化合物のライブラリーをスクリーニングすることができる。レポーター遺伝子アッセイを、第1線スクリーニングアッセイとして用いて、先導化合物を同定し、これを用いて、化合物の活性を促進するmRNA不安定性を比較するかまたは定量する、例えば医学的化学先導最適化／誘導体化プログラムから生成した化合物を比較することができる。

【0008】

従って、本発明の好ましい態様は、以下のものを提供する。

- i) mRNA分解を誘導する化合物の同定のためであり、化合物を、該化合物の

不存在下で検出可能なシグナルを有するタンパク質を発現することができるDNA発現システムと接触させ、ここでタンパク質をコードし、発現システムから転写されるmRNAは、mRNA不安定配列の少なくとも1つのコピーを含み、検出可能なシグナルを、試験化合物の存在下で測定し、得られた結果を対照と比較することを含む、方法、または

i i) mRNA分解を誘導する化合物の比較方法において、該化合物を、該化合物の不存在下で検出可能なシグナルを有するタンパク質を発現することができるDNA発現システムと個別に接触させ、ここでタンパク質をコードし、発現システムから転写されるmRNAが、mRNA不安定配列の少なくとも1つのコピーを含み、検出可能なシグナルを、各試験化合物の存在下で測定し、得られたシグナルを比較することを含む、前記方法。

【0009】

DNA発現システムは、代表的に、検出可能なシグナルを有するタンパク質の発現をコードする遺伝子を含み、ここで該遺伝子は、該タンパク質のアミノ酸配列を、プロモーターおよび／またはエンハンサー領域を含む適切な発現制御要素および特徴的にmRNA不安定配列の少なくとも1つのコピーに対応するDNAを含む関連する5'および3'UTR配列と共にコードするDNAを含む。プロモーター／エンハンサー配列の適切な選択および他の発現制御配列は、十分当業者の範囲内にある事項であり、本発明の大部分を形成しない。従って、例えば、哺乳動物における発現のために、ウィルスプロモーター、例えばSV40、CMVまたはHSV-1プロモーターを用いることができる。他方、mRNA不安定配列の適切な選択は、レポーター遺伝子アッセイの好首尾な機能遂行に重要であり、本発明の一部を形成する。

【0010】

従って、他の観点において、本発明は、検出可能なシグナルを有するタンパク質の発現をコードする遺伝子を含み、ここで、該遺伝子が、該タンパク質のアミノ酸配列を、適切な発現制御要素およびmRNA不安定配列の少なくとも1つのコピーに対応するDNAを含む関連する5'および3'UTR配列と共にコードするDNAを含む、レポーター遺伝子DNA発現システムを提供する。

【0011】

mRNA不安定配列は、サイトカイン、ケモカインのための遺伝子、核転写因子、プロトオンコジーン、前初期遺伝子、細胞サイクル制御遺伝子、オキシゲナーゼ、アポトーシスに関連し、これを制御する遺伝子を含む多数の一時的に発現された遺伝子のUTR、特に3'UTRにおいて同定された。mRNA不安定配列を含む天然のRNA配列は、あるいはまたアデニレート／ウリジレート(AU)に富む要素、またはAREと呼ばれる。mRNA不安定配列を含む一時的に発現された遺伝子は、例えば、GM-CSF、c-fos、c-myb、c-jun、krox-20、nur-77、zif268、bcl-2、β-IFN、uPA、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-13、TNF-α、MCP-1、syn1、β₂-AR、E-セレクチン、VCAM-1、ICAM-1、Gro-α、Gro-β、MMP-1、MMP-2、コラゲナーゼ、P-糖タンパク質(MDR)、MRP、P_γh1(pf_mdr)、COX-IIおよびMIP-2αをコードする遺伝子を含む。

【0012】

以下の刊行物は、mRNA不安定配列およびARE、これらが含む配列モチーフおよびmRNA不安定化に対する(最小)配列要求並びに多くのmRNA不安定配列およびこれらを含む遺伝子の同定の広範囲な討議を含む：

【外1】

Shaw & Kamen, Cell, Vol. 46, 659-667, August 29 1986 (GM-CSF);
Shyu et al., Genes & Development, 5:221-231 (1991) (c-fos);
Sachs, Cell, Vol. 74, 413-421, August 13 1993 (論評 “Messenger RNA Degradation in Eukaryotes”);
Chen et al., Mol. Cell. Biol., Jan 1994, p 416-426 (c-fos);
Akashi et al., Blood, Vol. 83, No. 11, (June 1), 1994: pp 3182-3187 (GM-CSF 等);
Nanbu et al., Mol. Cell. Biol., July 1994, p. 4920-4920 (Upa);
Stoecklin et al., J. Biol. Chem., Vol. 269, No. 46, November 18 1994, pp 28591-28597 (IL-3);
Lagnado et al., Mol. Cell. Biol., Dec. 1994, p. 7984-7995 (一般);
Zhang et al., Mol. Cell. Biol., Apr. 1995, p. 2231-2244 (酵母);
Zubiaga et al., Mol. Cell. Biol., Apr. 1995, p. 2219-2230 (一般);
Winstall et al., Mol. Cell. Biol., July 1995, p. 3796-3804 (c-fos, GM-CSF);
Chen et al., Mol. Cell. Biol., Oct. 1995, p. 5777-5788 (c-fos, GM-CSF);
Chen et al., TIBS 20 November 1995, 465-470 (論評);
Levy et al., J. Biol. Chem., Vol. 271, No. %, February 2 1996, pp. 2746-2753 (VEGF);
Kastelic et al., Cytokine, Vol. 8, No. 10 (October), 1996: pp751-761;
Crawford et al., J. Biol. Chem., Vol. 272, No. 34, August 22 1997, pp. 21120-21127 (TNF- α);
Xu et al., Mol. Cell. Biol., Aug. 1997, Vol. 18, No. 8, p. 4611-4621 (一般);
Danner et al., J. Biol. Chem., Vol. 273, No. 6, February 6 1998, pp. 3223-3229 (ヒト β_2 -アドレナリン性受容体);
Lewis et al., J. Biol. Chem., Vol. 273, No. 22, May 29 1998, pp. 13781-13786 (TNF- α);
Chen, C.-Y. and Shyu, A.-B. Mol. Cell. Biol. Vol.14, No.12, 1994, pp. 8471-8482; および
Klausner, R. et al., Cell, Vol. 72, 1993, pp. 19-28.

【 0 0 1 3 】

前述の刊行物に記載されたように、mRNA不安定配列はしばしば、例えば以下のもの：

AUUUA ; UAUUUAU ; UUAUUUA (U/A) (U/A) およびAU
UUAUUUA

から成る群から選択された配列モチーフの1つまたは2つ以上のコピーを含む。従って、本発明において用いるためのmRNA不安定配列は、通常、少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つまたは3つ以上、好ましくは少なくとも3つのこのような配列モチーフまたはこの部分（例えば通常、モチーフからの少なくとも4つの連続するヌクレオチドを含む）を、適切な並列において、通常例えばタ

ンデム繰り返しとして、または他の、例えば介在するRNA配列と共に、含む。代表的に、mRNA不安定配列は、約20～約100またはそれ以上まで、好ましくは約30～約50の長さのヌクレオチドを含む。mRNA不安定配列は、適切な遺伝子の3'UTRからの制限フラグメントとして、または新規な合成ヌクレオチド配列として誘導することができる。あるいはまた、mRNA不安定配列を含む適切な天然の遺伝子配列の3'UTRの全体または大部分を、用いることができる。

【0014】

前述の刊行物において記載されているものまたはこの機能的に等価な変種を含むすべてのmRNA不安定配列またはAREに対応するDNAを、本発明のDNA発現システムにおいて用いることができる。しかし、好ましくは、用いられるmRNA不安定配列は、関連する疾病に関係するタンパク質をコードするmRNAから誘導されたものである。従って、例えば、特定の疾病プロセスの病因に関連するサイトカインまたは腫瘍遺伝子をコードするmRNAを不安定化する化合物の検出において用いるためのmRNA不安定配列は、好ましくは、当該サイトカインまたは腫瘍遺伝子をコードする遺伝子から誘導され、例えば慢性関節リウマチまたは変形性関節症のIL-1により媒介された疾病的治療のための先導化合物は、好ましくは、IL-1 mRNA不安定配列を含むレポーター遺伝子発現システムを用いて検出される。

【0015】

従って、本発明の例示により、IL-1 β mRNAを不安定化する化合物の同定において用いるための好ましいmRNA不安定配列は、IL-1 β mRNAの3'UTR、即ち図1に示す配列から誘導される。一層好ましくは、IL-1 β mRNA不安定配列は、IL-1 β mRNAの3'UTRのフラグメントを含むことができる。例えば、特に好ましいIL-1 β mRNA不安定配列は、IL-1 β mRNAの3'UTRから誘導される30個のヌクレオチド配列を含む(図2に示す)。

【0016】

好ましくは、mRNA不安定配列は、レポーター遺伝子の3'UTR中に位置

する。従って、例えば、mRNA不安定配列に対応するDNA配列は、適切なDNAセグメントまたはこの一部として、生来のレポーター遺伝子の3'UTR中の適切な制限部位中に挿入される。

【0017】

DNA発現システムは、好ましくは、有利には適切に形質転換した細胞系、好ましくは安定に形質転換した細胞系の形態での、細胞に基づく発現システムである。ホスト細胞は、代表的には、真核ホスト細胞、特に動物ホスト細胞、特に哺乳類ホスト細胞である。

【0018】

好ましくは、ホスト細胞は、不安定化することが望まれるmRNAによりコードされるタンパク質を発現する細胞と同一の一般的細胞タイプである。従って、例えば、本発明のアッセイを、サイトカインをコードするmRNAを不安定化する化合物の同定に用いるべき場合には、用いられるホスト細胞は、好ましくは、通常当該サイトカインを生成する細胞と同一または類似する細胞タイプの細胞または細胞系である。例えば、単球または単球状細胞系を、サイトカイン、例えばIL-1 β mRNAを不安定化する化合物をアッセイするためのホスト細胞として用いることができる。腫瘍遺伝子および他の癌関連遺伝子mRNA不安定アッセイに好ましい細胞系は、例えば、Colon205、KB31、KB8511、DU-145、HCT116、MCF7、MCF7/ADR、MDA-MB-231、MDA-MB-435およびMDA-MB-435/TOである。サイトカイン、例えばIL-1 β mRNAを不安定化する化合物の同定のために本発明のアッセイにおいてホスト細胞として用いるため特に好ましい細胞系は、THP-1細胞系（例えばAuwerx J. (1991), Experientia, 47: 22-30により記載されたように）および同様の単球、例えばヒト白血病細胞系である。

【0019】

また好ましくは、mRNA不安定配列およびホスト細胞は、不安定化することが望ましい生来のmRNAおよび当該mRNAがそれぞれ生成する生来の細胞タイプから誘導される。従って、例えば、サイトカインmRNAを不安定化する化合物の同定のために、mRNA不安定配列は、好ましくは、当該サイトカインを

コードするmRNAから誘導され、ホスト細胞は、好ましくは、サイトカインmRNAが生成する生来の細胞タイプと同一の細胞タイプである。例えば、IL-1 β mRNAを不安定化する化合物の同定のために、mRNA不安定配列は、好ましくは、IL-1 β mRNAの3'UTRから誘導され、用いられるホスト細胞は、単球型細胞、例えばTHP-1細胞である。

【0020】

mRNA不安定化の機構およびこれにおけるmRNA不安定配列の役割は、完全には理解されていないが、不安定化化合物およびmRNA不安定配列以外の他の要因の存在が、例えば前に同定した文献参照において討議されたように、mRNA不安定化が発生するのに必要であることが明らかである。有利には、このような他の要因は、形質転換したホスト細胞環境により提供され、化合物およびmRNA不安定配列の相互作用を補足するかまたは完全にして、mRNAの不安定化を行う。好ましくは、形質転換したホスト細胞を、刺激するかまたは他の方法で活性化して、mRNA不安定化を、例えばmRNA不安定化に必要な細胞因子の提供された、高められたレベルまで増大させることができる。特に、本発明者等は、分化した形質転換したホスト細胞を用いる場合に本発明のアッセイにおいて改善された結果が得られることを見出した。例えば、形質転換したTHP-1細胞の場合において、本発明者等は、形質転換したTHP-1細胞を、例えば例中に以下に記載するように、THP-1細胞に通常であるように、 γ IFNおよびLPSと共に成長させ、分化させ、刺激する場合に、最良の結果が得られることを見出した。

【0021】

レポーター遺伝子mRNAによりコードされるタンパク質は、これ自体、検出可能なシグナルを含む。例えば、タンパク質は、蛍光タンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質を含むことができる。しかし、好ましくは、タンパク質は、適切な基質または他の物質と反応して検出可能なシグナルを与えることができるようなものである。有利には、mRNAによりコードされたタンパク質は、酵素または酵素の酵素的に活性なフラグメントである。適切な酵素の例は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラー

ゼ (C A T) 、アルカリ性ホスファターゼ (A P) 、分泌されたアルカリ性ホスファターゼ (S E A P) 、 β -ガラクトシダーゼまたは特にルシフェラーゼを含む。このような酵素を検出し、決定するための方法は、例えばルシフェラーゼ発現のレベルを決定するために以下に記載する適切な基質および測定を用いて、十分知られている。しかし、すべての適切な検出可能なタンパク質および測定手順を用いることができるることを、理解するべきである。

【0022】

本発明のアッセイにおいて、mRNAを不安定化する化合物の存在は、対照と比較しての化合物の存在下での発現システムから生成したタンパク質により与えられる検出可能なシグナルの規模の低下により示される；レポーター遺伝子mRNAの化合物による不安定化により、タンパク質の発現の低下および従ってシグナルの規模の減少に至る。本発明のアッセイにおいて用いるのに適する対照は、レポーター遺伝子DNA発現システムに対応するDNA発現システムを含み、即ち、検出可能なタンパク質の発現をコードする配列を含むが、これは、mRNA不安定配列に対応する配列を含まない。好ましくは、制御DNA発現システムは、mRNA不安定配列に対応するDNAが、mRNA不安定配列として除去、削除または他の方法で不可能となったこと以外は、レポーター遺伝子発現システムと同一である。好ましくは、制御DNA発現システムはまた、形質転換した細胞系の形態であり、代表的には、レポーター遺伝子形質転換細胞系と同一のホスト細胞系、例えばTHP-1細胞系から誘導される安定に形質転換される細胞系である。

【0023】

従って、好ましい態様において、本発明は、mRNAを不安定化する化合物の同定のためのアッセイシステムにおいて、

前述のように定義したレポーター遺伝子DNA発現システム、および
検出可能なシグナルを有するタンパク質の発現をコードする遺伝子を含み、ここで該遺伝子は、該タンパク質のアミノ酸配列を、適切な発現制御要素を含むが機能的mRNA不安定配列を欠く関連する5'および3'UTR配列と共にコードするDNAを含む、制御DNA発現システム

を含む、前記アッセイシステムを提供する。

【0024】

好ましくは、レポーター遺伝子DNA発現システムと制御DNA発現システムとは、共に安定にトランسفェクトされた細胞系の形態である。

【0025】

あるいはまた、レポーター遺伝子発現システムを、試験化合物の存在下および不存在下で試験して、試験化合物の不存在下での試験を対照として用いることができる。他の代替的な態様において、制御DNA発現システムはまた、レポーター遺伝子DNA発現システムと同一の細胞系中に存在することができる。この場合の制御DNA発現システムは、レポーター遺伝子発現システムによりコードされたタンパク質とは異なる検出可能なタンパク質をコードし、前述のように、制御DNA発現システムは、機能的mRNA不安定配列をすべて欠く。

【0026】

本発明を、本発明の特定のアッセイに関連し、添付した図面に言及する以下の例のみにおいて本発明を例示することによりさらに記載する。

【0027】

例

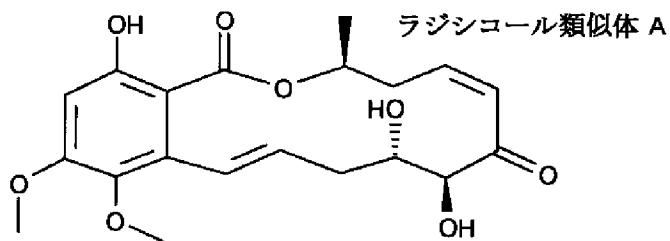
本発明者等は、前に (Kastelic et al., CYTOKINE, Vol. 8, No. 10 (10月), 1996: pp751-761) 、ラジシコール類似体A (以下に示す化合物) が、mRNAに、mRNA不安定性を受ける遺伝子の3'未翻訳領域 (3'UTR) 中に位置するAUに富む要素 (ARE) を通して付与することを示した。これらの研究において、すべてのAREを含むIL-1 β の3'UTRのセグメントを削除し、得られたIL-1 β -AU cDNAを、発現ベクター中にサブクローン化した。この構造物を含む安定にトランسفェクトしたTHP-1細胞を、RNアーゼ保護法 (Kastelic et al. 同上) により分析し、ラジシコール類似体Aに対するAU欠損誘導化 (AU-less derived) RNAの耐性を示した。

【0028】

IL-1 β mRNAの3'UTRは、3つがタンデムにある (図1参照) 合計6つのAUUUAモチーフを含む。ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

の構成について、本発明者等は、3つのタンデム繰り返しを含む図1に示す下線を付した配列を含むフラグメントのみを用いた。Zubiaga et al (同上)による発見は、mRNA不安定モチーフの最小の配列が、ただAUUUA単独であるよりむしろUUUAUUUAUU (本発明者等が用いた挿入された30bp IL-1 β フラグメント中に生じる配列) であることを示す。

【化1】



【0029】

例1：pGL2_Neo30および安定細胞系の構成

THP-1細胞中への安定な統合のためのベクターを得るために、pMC1neo (Stratagene) から得られたneo耐性遺伝子 (アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼを発現する) のXhol-SalI フラグメントを、pGL-2対照(Promega)のSalI部位中にサブクローン化した。この得られたプラスミドを、pGL2_Neoと呼んだ。2つの相補的な合成オリゴヌクレオチド (図2参照) をアニーリングすることにより得られた30bpフラグメント (IL-1 β 3'UTR配列に基づく3つのタンデムAUUUAモチーフを含む) を、pCGL2_Neo中に、Pf1MI制限部位を用いてサブクローン化した。この結果、ルシフェラーゼ発現ベクターpGL2_Neo30が得られた (図3)。図2は、pGL2_NeoのPf1MI部位中につなぐのに用いる3つのタンデムAUUUAモチーフを含むIL-1 β 3'UTR配列を示す。発現ベクターpGL-2- β ガラクトシダーゼ(Promega)は、pGL2_Neo30およびpGL2_Neo中のルシフェラーゼ遺伝子と同一のプロモーター (SV40) により駆動されるlacZ遺伝子を有するが、プラスミドpGL2- β -ガラクトシダーゼは、mRNA不安定配列を含まない。

【0030】

次に、THP-1細胞を、pGL2_Neoベクターでトランسفェクトするか（対照細胞系を生じるために）、またはエレクトロポレーションによりpGL2_Neo30ベクター-pGL2- β -ガラクトシダーゼで同時形質移入した。

1. 3 mMのKH₂PO₄、7. 36 mMのNa₂HPO₄、2. 44 mMのKC1、124 mMのNaCl、5 mMのグルコース、9. 6 μ MのMgCl₂および16 μ MのCaCl₂、pH 7.2中の10⁷個の細胞/m1を、バイオラッジーンパルサー(Bio-Rad Gene Pulser) (250V、690 μ Fおよび不定の抵抗) 中の20 μ gのDNAで、0.4 cmのキュベットを用いてトランسفェクトした。細胞をその後、10%FBS、2 mMのL-Gln (L-グルタミン)、50 μ Mの2-メルカプトエタノールおよび600 μ g/m1のG418 (ジェネティシン(geneticin)) を含むRPMI培地中で培養した。pGL2_Neo30およびpGL2_NeoのTHP-1細胞中へのトランسفェクションの後、安定な細胞系を、G418耐性についての選択により得、ルシフェラーゼ活性についてアッセイした（および、同時形質移入した細胞系はまた、内部対照として作用することができる β -ガラクトシダーゼ活性についてアッセイした—以下の例5参照）。各トランسفェクションの1つの細胞系を、さらなる分析のために選択した；pGL2_Neo30/pGL2- β -ガラクトシダーゼ細胞系を、クローン番号63と呼び、pGL2_Neo細胞系を、クローン番号53と呼ぶ。外因性ルシフェラーゼ活性は、通常のTHP-1細胞においては検出できなかった。

組織培養およびルシフェラーゼ活性測定を、以下に記載するようにして実施した。

【0031】

組織培養：

トランسفェクトしたヒト単球白血病細胞系、クローン番号53および63を、110U/m1のペニシリン、100 μ g/m1のストレプトマイシン、2 mMのL-Glnおよび2 g/lのNaHCO₃を補足したRPMI培地中で成長させた。熱処理したFBS (5%) を、使用前に加えた。細胞を、5 × 10⁵/

$m l$ の密度に成長させ、 $1000 U/m l$ (最終濃度) の γIFN での分化を誘導した。3時間後、 $10 \mu l$ の LPS ($5 \mu g/m l$ の最終濃度) を加えた。この時点を、時間 0 とした。示したように、LPS の添加後、化合物を、種々の時間において加えた。

【0032】

ルシフェラーゼ活性測定：

系を 96 ウェルプレートの使用に適合させるために、細胞を、フェノールレッド (AMIMED) を欠く RPMI 培地中のパッカード (Packard) 平坦底白色ポリスチレンマイクロプレート (Cat. No. 6005180) 中で成長させた。細胞を、 5×10^4 / ウェルで蒔いた。細胞の処理後、ルシフェラーゼを、パッカードルクライト (Packard Luc Lite) システム (Cat. No. 601691-1) を用いて、製造者の指示に従って $205 \mu l$ の最終容積に計量した。要するに、 5×10^5 細胞 / $m l$ の細胞懸濁に、 γIFN ($1000 U/m l$ ベーリンガーマンハイム (Boehringer Mannheim) No. 1050494) を最終濃度 $100 U/m l$ に、および $0.25\% (v/v)$ のルクライトエンハンサー (Luc Lite Enhancer) を加えた。3時間のインキュベーションの後、LPS ($50 \mu g/m l$ の SIGMA L-8274) を加えて、 $5 \mu g/m l$ の最終濃度を得た。次に、細胞を、 $5 \times 10^4 / 100 \mu l$ / ウェルにおいて平坦底白色ポリスチレンマイクロプレート (Packard, Cat. No. 6005180) 中に蒔き、16時間インキュベートした。次に、 $5 \mu l$ の化合物溶液または対照ビヒクルを加え、細胞を、示したようにさらにインキュベートした。 $100 \mu l$ のルシフェラーゼ基質溶液を加え、プレートを、トップシール (Top-Seal) - A プレスオン接着密封フィルム (Packard, Cat. No. 6005185) で覆い、その後 $22^\circ C$ でパッカードトップカウントシンチレーションカウンター (Packard Top Count Scintillation Counter) でルミネセンスを測定した。ルシフェラーゼシグナルは、少なくとも 90 分間安定であった。

【0033】

2つの細胞系、番号 53 (A) および 63 (B) におけるルシフェラーゼ活性の分化依存誘導を試験し、得られた結果を図 4 A および B に示す。両方のクロー

ンにおいて、ルシフェラーゼ発現の明白な誘導を観察することができ、アッセイの時間にわたり高いレベルの活性を維持した。ルシフェラーゼのこの高いかつ一定の発現を、mRNA不安定を誘導する化合物の効果を分析する際に、念頭に置くべきである。mRNA分解は、新規な転写と一定に競合し、これとは異なり、野生型THP-1細胞の状態は、IL-1 β -mRNAの場合であり、最高のレベルが、LPS添加の16時間後に得られた。ルシフェラーゼの場合に、転写が高いままであるため、mRNA不安定化薬剤の一層弱い影響を観測することが予測される。事実、これは、ラジシコール類似体Aの場合に本発明者等が観測したことである。以下参照。

【0034】

例2：ルシフェラーゼmRNAおよびタンパク質の半減期

ルシフェラーゼタンパク質活性を用いてmRNA分解を測定するためには、ルシフェラーゼ酵素の半減期を知って、有力なmRNA不安定化剤をルシフェラーゼタンパク質安定性によりアッセイするための最適な時間を決定することが重要である。mRNAが分解し得るが、タンパク質の長い半減期のために、高い酵素活性が持続する可能性が存在する。従って、本発明者等は、転写阻害剤アクチノマイシンD (act. D) または翻訳阻害剤シクロヘキシミド (CHX) の添加後にルシフェラーゼ活性を分析した。図5は、20 μ g/mlのact. Dの存在下で、および20 μ MのCHXの存在下で、ルシフェラーゼ活性は迅速に低下して、8時間のインキュベーションの後に、ラジシコール類似体Aにより達成された阻害に相当するレベルに達することを示す。ルシフェラーゼ酵素のこの比較的短い半減期の観点において、化合物の添加後8時間という早期にmRNA分解に対する活性のために、すべての物質を評価するのは、確実である。

【0035】

例3：ラジシコール類似体Aの効果

THP-1細胞系、クローン番号63 (pGL2-Neo3.0を含む) およびクローン番号53 (pGL2-Neoを含む) を成長させ、 γ IFNで分化させ、通常のTHP-1細胞と同一のLPSで刺激した。ラジシコール類似体Aを、LPSの添加の16時間後に加え、次いで細胞抽出物を、示したように8時間後に

採取した。ルシフェラーゼ活性を、平均で 50%+/-17% の $1 \mu M$ のラジショール類似体 A により阻害し、いくつかの場合において阻害は、93% 程度に大きく、一方 $5 \times 10^{-6} M$ のラジショール類似体 A は、対照クローン番号 53 に對して影響しなかった、図 6 (黒色棒はクローン番号 53 を示し、白色棒はクローン番号 63 を示す)。

【0036】

興味深いことに、未分化 (undiff) クローン番号 63 (白色棒) は、ラジショール類似体 A で処理したときにルシフェラーゼ活性の限定された低下のみを示し (図 7、黒色棒はクローン番号 53 を示す)、これは、ルシフェラーゼの一層低い発現のためであるかまたは AU に富む要素により媒介された mRNA 分解プロセスにおける、異なって発現したかまたは変更された成分を伴うことを示す。事実、リボプローブとしての IL-1 β の AU に富む 3' UTR の 241 bp を用いるゲル遅延実験は、 γ IFN 誘導分化または変更 (示していない) を有する追加のタンパク質の結合を示した。

【0037】

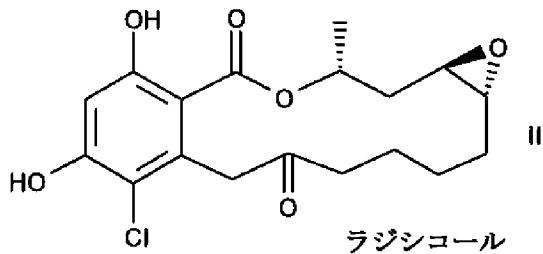
ルシフェラーゼ活性の濃度依存性阻害を、図 8 に示す。 $5 \times 10^{-6} M$ より高いラジショール類似体 A の濃度はまた、転写時の細胞毒性または阻害活性のために、対照クローンを阻害した。

【0038】

例 4：多数の選択された物質に対するアッセイの適用

多数の選択された物質を、実質的に例 3 (分化した細胞について) に記載したように、アッセイにおいてこれらの活性について試験した。得られた結果を、以下の表 1 に示す。ラジショール (以下の式 II 参照) およびラジショール類似体 A は、mRNA 安定性に対して明白な効果を示し；他の試験した化合物は、用いたアッセイにおいて活性を示さなかった。

【化2】



【表 1】

表 1

化合物	ルシフェラーゼ活性（対照の%）	
	クローン番号 53	クローン番号 63
ペプチド ICE インヒビター	87	104
ステムフォン	95	90
ラジシコール	98	47
(17 α)-23-(E)-ダマラ-20,23-ジエン-3 β ,25-ジオール	116	91
ラジシコール類似体 A	120	49
サリドマイド	98	112
デキサメタゾン	72	63
シクロスボリン A	82	74

[0039]

例5：単一の細胞系を用いたアッセイの適用

前の例において、試験化合物を、2つの別個の細胞系（クローン53およびクローン63）におけるこれらの活性を比較することにより、アッセイした。しかし、クローン63を、2つの別個のプラスミドで同時形質移入した：一方のプラスミド（pGL2_Neo30）は、SV40プロモーターにより駆動された30bp不安定配列を有するルシフェラーゼ遺伝子を含み、他方のプラスミド（pGL2- β -ガラクトシダーゼ）は、SV40プロモーターにより駆動された1a c Z遺伝子を含むが、mRNA不安定配列を含まない。この細胞系の β -ガラクトシダーゼ活性は、mRNA不安定配列によりmRNA不安定性を促進する化

合物に対する細胞の暴露により実施されるべきではない。この結果、単に刺激していない細胞におけるルシフェラーゼ活性を刺激した細胞に対して比較し、これらの同一の細胞における β -ガラクトシダーゼ活性を比較することにより、mRNA不安定活性を有する化合物を（理論において）スクリーニングすることができる。この仮説を試験するために、クローン63（刺激したおよび刺激していない細胞）におけるルシフェラーゼ活性および β -ガラクトシダーゼ活性に対するラジシコール類似体Aの効果を、クローン63およびクローン53の刺激したおよび刺激していない細胞についてのラジシコール類似体Aの効果と比較した。アッセイを、前の例に記載したようにして実施した。表2は、クローン63および53の γ IFN/LPS刺激および未刺激細胞におけるラジシコール類似体Aの種々の濃度のルシフェラーゼ活性を示す。活性は対照の%で示し、細胞数について制御された3つの独立の実験の手段に基づく。表3は、クローン63の刺激したおよび刺激していない細胞における β -ガラクトシダーゼ活性を示す。活性は、対照の%で示し、細胞数について制御された3つの独立の実験に基づく。データから、表2のアッセイおよび表3のアッセイは、共に活性化合物としてラジシコール類似体Aを同定したことが明らかである。

【表2】

表2

ルシフェラーゼ活性				
	クローン 63		クローン 53	
	未刺激	γ IFN/LPS 刺激	未刺激	γ IFN/LPS 刺激
	(%対照)	(%対照)	(%対照)	(%対照)
化合物なし	100	100	100	100
1 μ Mラジシコール 類似体 A	63	7	nd	88
10 μ Mラジシコール 類似体 A	11	2	87	63

【表3】

表3

β-ガラクトシダーゼ活性				
	クローン 63		クローン 53	
	未刺激	γIFN/LPS 刺激	未刺激	γIFN/LPS 刺激
	(%対照)	(%対照)	(%対照)	(%対照)
化合物なし	100	100	100	100
1 μMラジシコール 類似体 A	96	97	99	98
10 μMラジシコール 類似体 A	84	70	103	62

【図面の簡単な説明】

【図1】 IL-1 β 3' UTRのDNA配列を示す図である。

【図2】 例1におけるmRNA不安定配列として用いる30 bp フラグメントを示す図である。

【図3】 pGL2_Neo3.0およびpGL2対照についてのプラスミド図を示す図である。

【図4】 クローン番号53 (A) およびクローン番号63 (B) についての分化の時間にわたるルシフェラーゼ活性のグラフを示す図である。

【図5】 ラジシコール類似体A (SDZ 216-732)、アクチノマイシンD (act D) およびシクロヘキサミド (CHX) で処理したクローン53 および63についての化合物の添加後4時間および8時間におけるルシフェラーゼ半減期のグラフである。

【図6】 種々の濃度のラジシコール類似体A (SDZ 216-732) で処理したクローン53 (黒色棒) および63 (白色棒) からのルシフェラーゼ活性のグラフである。

【図7】 ラジシコール類似体Aで処理した未分化 (undiff) および分

化 (diff) クローン 5 3 (黒色棒) およびクローン 6 3 (白色棒) についてのルシフェラーゼ活性を示すグラフである。

【図 8】 ラジシコール類似体 A によるルシフェラーゼ活性の濃度阻害のグラフである。

【図 1】

* GGACCAAAGG CGGCCAGGAT ATAAC TGACT TCACC ATGCA
ATT TGT GTCT TCCTAAAGAG AGCTGTACCC AGAGAGTCCT
GTGCTGAATG TGGACTCAAT CCCTAGGGCT GGCAGAAAGG
GAACAGAAAG GTTTTGAGT ACGGCTATAG CCTGGACTTT
CCTGTTGTCT ACACCAATGC CCAACTGCCT GCCTTAGGGT
AGTGCTAAGA GGATCTCCTG TCCATCAGCC AGGACAGTCA
GCTCTCTCCT TTCAGGGCCA ATCCCAGCCC TTTTGTGAG
CCAGGCCTCT CTCACCTCTC CTACTCACTT AAAGCCGCC
TGACAGAAAC CAGGCCACAT TTTGGTTCTA AGAAACCC
CTCTGTCACTT CGCTCCCACA TTCTGATGAG CAACC GCTTC
CCT ATTTATTTATTTA TTTG TTTGT TTGTT TTGATT CATT
GGTCTA **ATTTA** TTCAAAGGG GGCAAGAAGT AGCAGTGCT
GTAAAAGAGC CTAGTTTTA ATAGCTATGG AATCAATTCA
ATTTGGACTG GTGTGCTCTC TTTAAATCAA GTCCTTTAAT
TAAGACTGAA AATATATAAG CTCAGATT **ATTTA** AATGGGA
AT **ATTTA** TAA ATGAGCAAAT ATCATACTGT TCAATGGTC
TCA **AATAAA** C TTCACT

【図 2】

ATGGCTTCCCTATTTATTTATTTATTTGTTGTCCAACCT
||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
GGATACC GAAGGGATAAATAAAATAAAACAAACAGGTT

【図3】

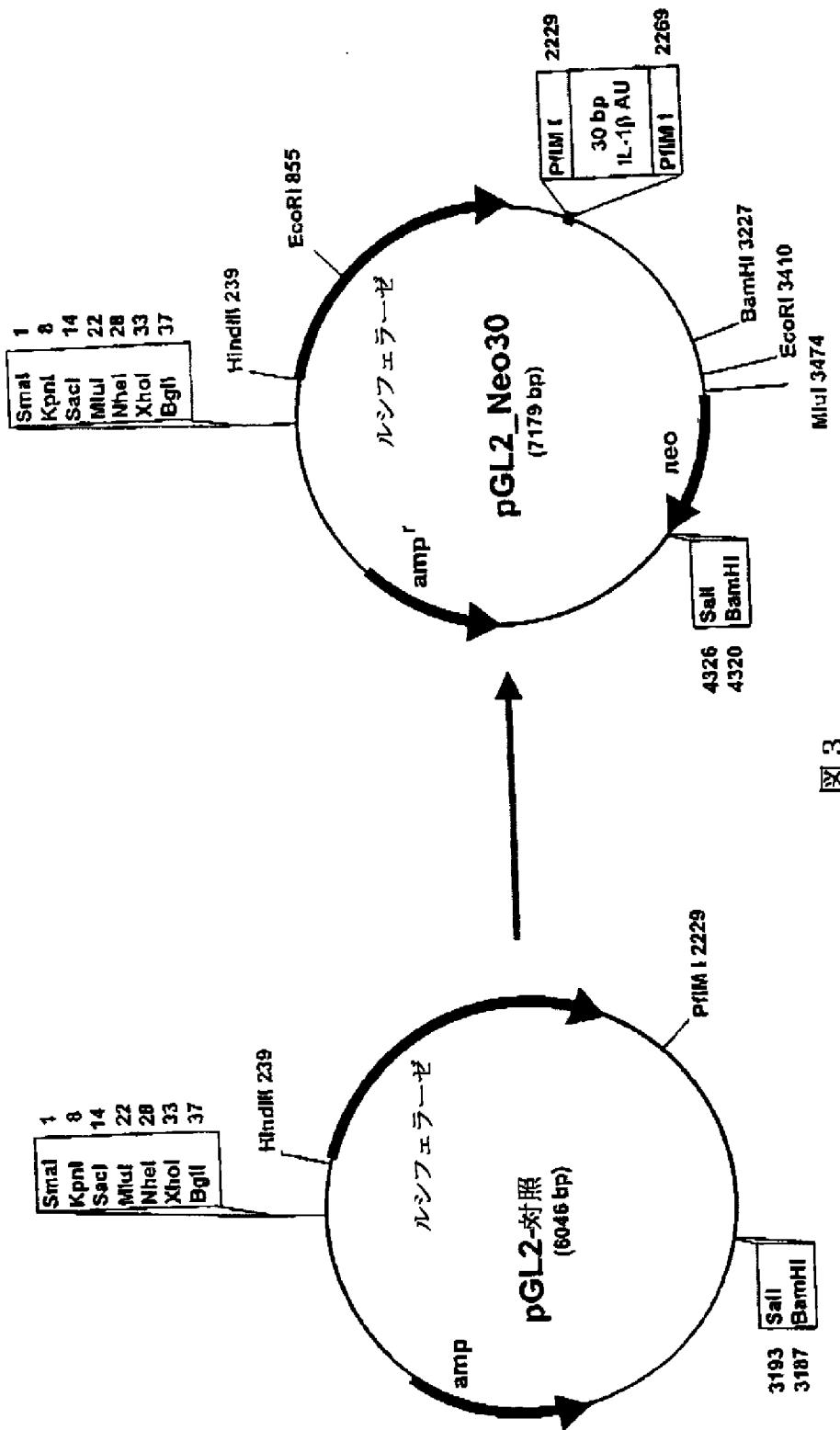
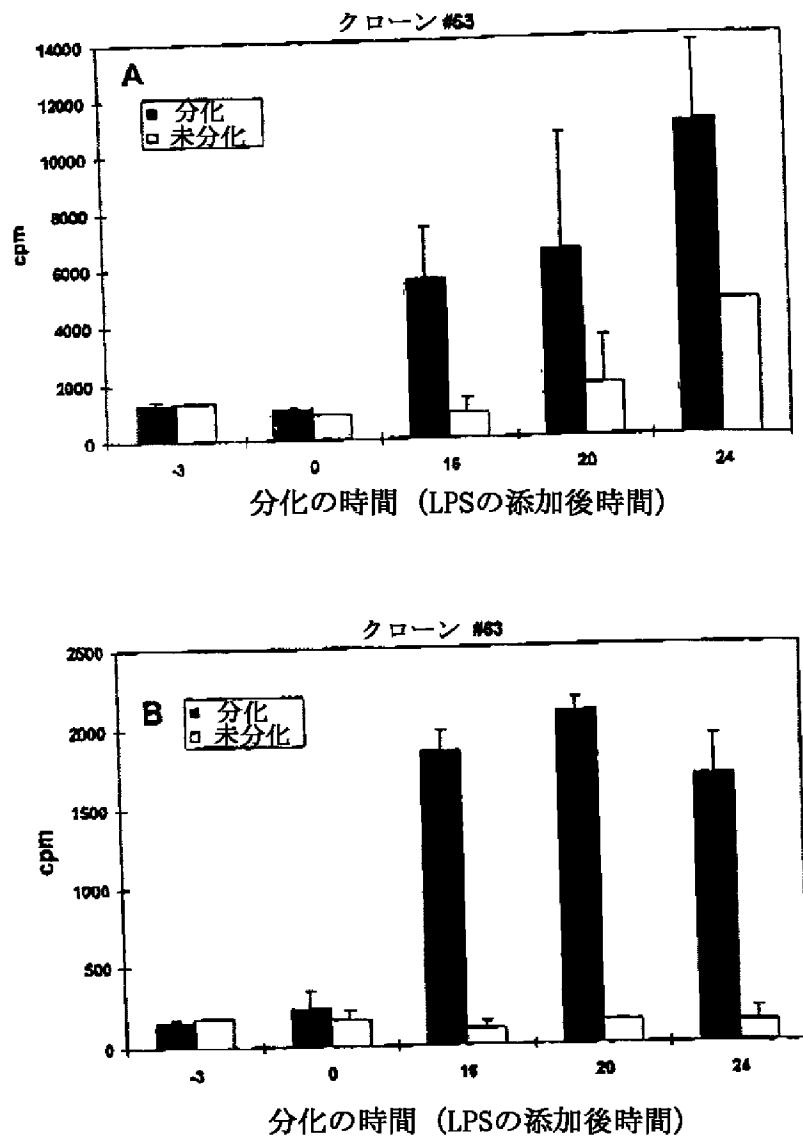
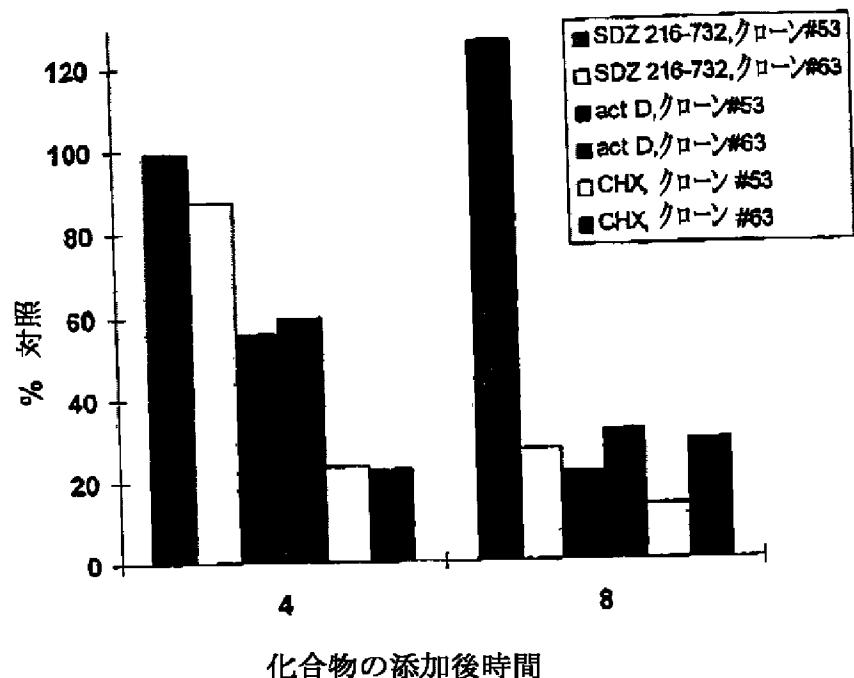


図3

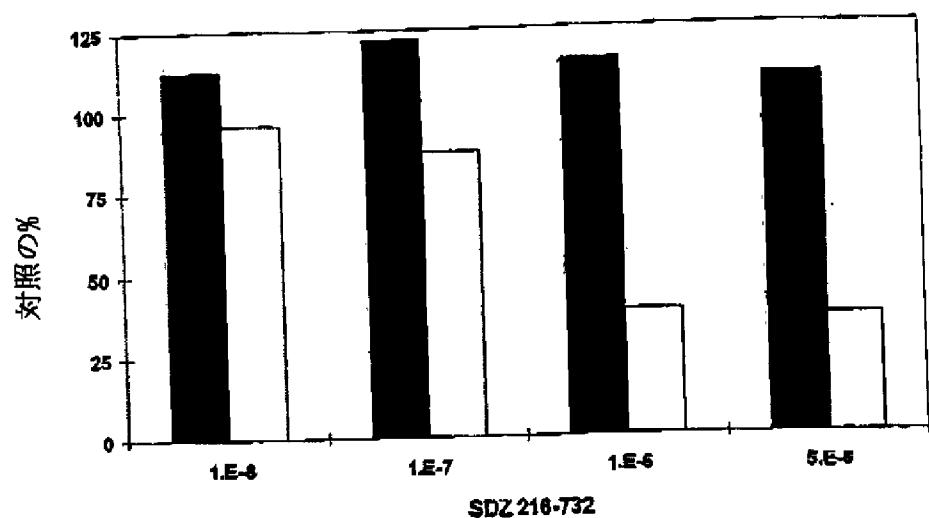
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

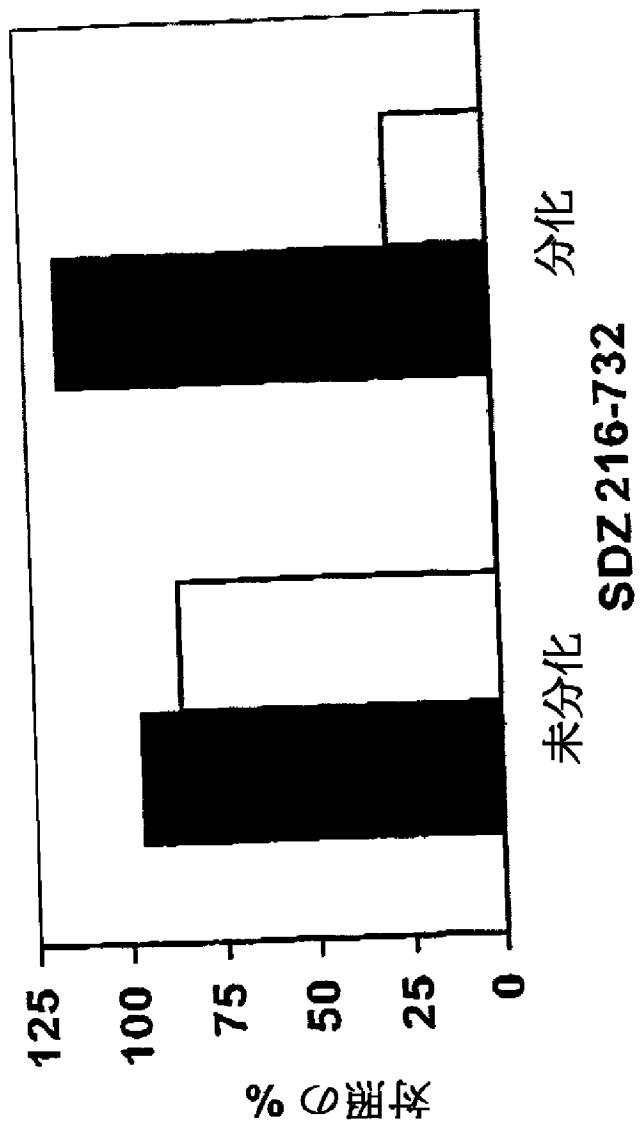
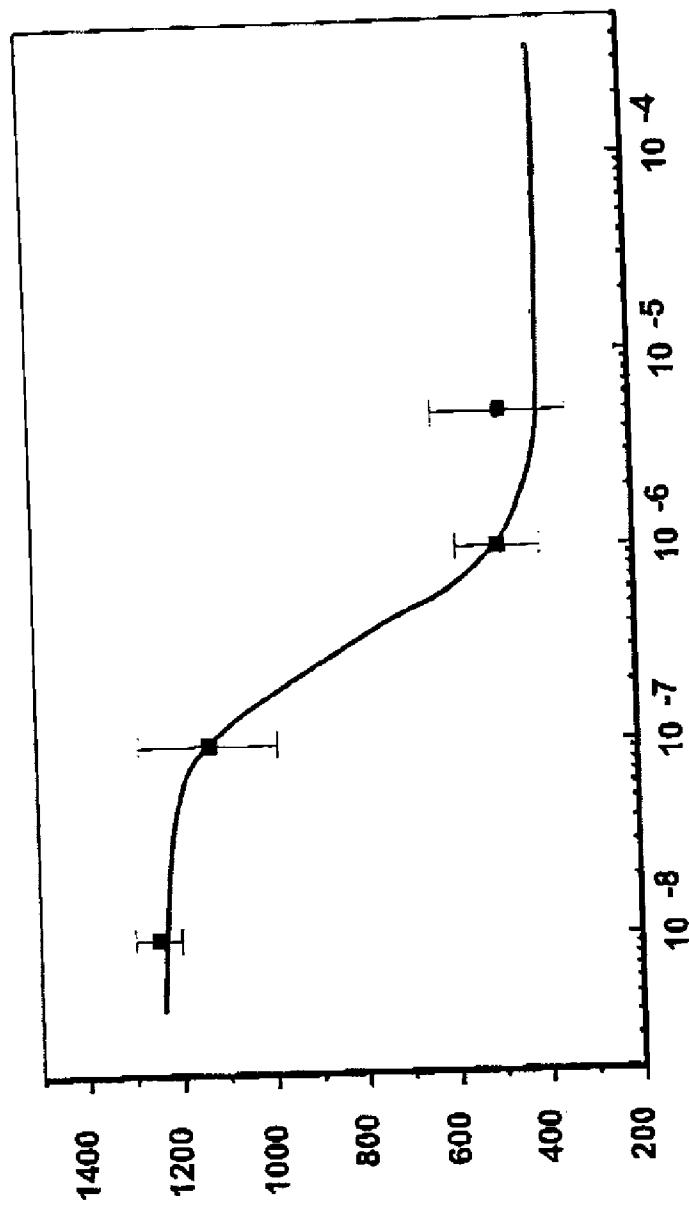


図7

【図8】



SDZ 216-732

図8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 99/01235

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 7 C12N15/85 C12N5/10 C12Q1/68 A61K35/00			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELDS SEARCHED			
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)			
IPC 7 C12C			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category ⁴	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	CASTELIC ET AL.: "INDUCTION OF RAPID IL-1BETA mRNA DEGRADATION IN THP-1 CELLS MEDIATED THROUGH THE AU-RICH REGION IN THE 3'UTR BY A RADICICOL ANALOGUE" CYTOKINE, vol. 8, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 751-761, XP002138167 cited in the application the whole document	1-11	
X	BANHOLZER ET AL.: "RAPAMYCIN DESTABILIZES INTERLEUKIN-3 mRNA IN AUTOCRINE TUMOR CELLS BY A MECHANISM REQUIRING AN INTACT 3'UNTRANSLATED REGION" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 17, no. 6, 1997, pages 3254-3260, XP002138168 the whole document	1-11	
-/-/-			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may show doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>			
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the International search report	
24 May 2000		06/06/2000	
Name and mailing address of the IBA		Authorized officer	
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Hagenmaier, S	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 99/01235

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 20212 A (US HEALTH ;PAVLAKIS GEORGE N (US); FELBER BARBARA K (US)) 14 October 1993 (1993-10-14) See page 25-page 30 the whole document	1-11
X	US 5 731 343 A (FENG LILI ET AL) 24 March 1998 (1998-03-24)	10,11
A	the whole document	1-9
A	WO 95 33831 A (CREATIVE BIOMOLECULES INC) 14 December 1995 (1995-12-14) the whole document	1-11

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 99/01235

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9320212	A 14-10-1993	AU 678157 B		22-05-1997
		AU 3969493 A		08-11-1993
		CA 2132208 A		14-10-1993
		DE 69327456 D		03-02-2000
		EP 0635062 A		25-01-1995
		JP 7509121 T		12-10-1995
		US 5972596 A		26-10-1999
		US 5965726 A		12-10-1999
US 5731343	A 24-03-1998	AU 5175296 A		11-09-1996
		CA 2213632 A		29-08-1996
		EP 0810860 A		10-12-1997
		WO 9625928 A		29-08-1996
WO 9533831	A 14-12-1995	AU 703445 B		25-03-1999
		AU 2822395 A		04-01-1996
		CA 2191583 A		14-12-1995
		EP 0804573 A		05-11-1997
		JP 10505223 T		26-05-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード ⁸ (参考)
C 1 2 N	5/10	C 0 7 D 313/00	
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 N 15/00	Z N A A
// C 0 7 D 313/00		5/00	A
(81)指定国 E P (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ , CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW , EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, C R, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI , GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, K Z, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA , MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, S K, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG , US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(72)発明者 シェヌヴアル, ドミニク カナダ、ブリティッシュ コロンビア ブ イ3ジェイ 3ビー6、コキトラム、リー ガン アベニュー 1323			
F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA21 CA02 CA12 HA17 4B063 QA08 QA18 QQ08 QQ22 QQ35 QQ53 QQ61 QR02 QR15 QR36 QR41 QR62 QR77 QS25 QX02 4B065 AA90X AB01 BB13 CA28 CA29 CA31 CA44 4C062 JJ70 4C084 AA17 NA14 ZB262 ZB272			